

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Studien zum submolekularen Aufbau
der ersten Komplementkomponente
Literaturübersicht und
experimentelle Untersuchungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Rainald Hussong
aus Greiz/Gera

Mainz 1973

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Studien zum

submolekularen Aufbau der ersten Komplementkomponente

Literaturübersicht und experimentelle Untersuchungen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Rainald Hussong
aus Greiz/Gera

MAINZ 1973



Fachbereichsdekan: Professor Dr. P. Klein

Referent: Professor Dr. R. Ringelmann

Korreferent: Professor Dr. P. Klein

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) <u>EINLEITUNG</u>	
Modell der Komplementreaktionen	1
Thema der Arbeit	3
B) <u>LITERATURÜBERSICHT</u>	
1. Vorkommen von C1	5
2. Nachweismethoden	5
3. Reindarstellung	6
4. Physikochemische Parameter	7
5. Reaktionswege von C1	10
6. Submolekularer Aufbau	12
7. Substrukturformel für C1	14
<u>ERGEBNISSE</u>	
1. Verhalten von C1 bei der Elektrophorese auf PAA	15
2. Verhalten von C1 auf der PAA nach Vorbehandlung von C1 mit Puffern höherer Salzkonzentration	18
3. Verhalten von C1 auf der PAA nach Vorbehandlung mit EDTA-haltigen Puffern	20
4. Verhalten von C1 bei längeren Laufzeiten	22
5. Verhalten von 0,9M NaCl vorbehandeltem C1 bei der Elektrophorese auf PAA unter verschiedenen Temperaturen	25
6. Verhalten von C1 nach Vorbehandlung mit Harnstoff	26
7. Verhalten von C1 nach Vorbehandlung mit Harnstoff und SDS	27
8. Verhalten von C1 auf der PAA unter einem veränderten Laufpuffer	28
9. Bestimmung der Molekulargewichte der einzelnen Banden mit Hilfe von Marker-Proteinen	28
C) <u>DISKUSSION</u>	31

D) MATERIAL und METHODEN

1. Charakterisierung und Präparation von reinem C1
2. Hämolytisches Testsystem
3. Polyacrylamid-Elektrophorese

E) LITERATURHINWEISEAbkürzungen

EDTA	= Ethylendinitrotetraessigsäure Dinatriumsalz (Dihydrat) Titriplex III
SDS	= Sodium-dodecylsulfat
PAA	= Polyacrylamid
OD	= Optical density
E	= Schafserythrozyten
EA	= E sensibilisiert mit Amboceptor
C	= Komplement
C1, C2 .. C9	= Komplementkomponenten
EAC $\bar{1}$	Die ersten drei Intermediärprodukte der
EAC $\bar{1}$ 4	= Komplementsequenz mit EA
EAC $\bar{1}$ 42	

Studien zum submolekularen Aufbau der
ersten Komplementkomponente

Literaturübersicht und experimentelle Untersuchungen

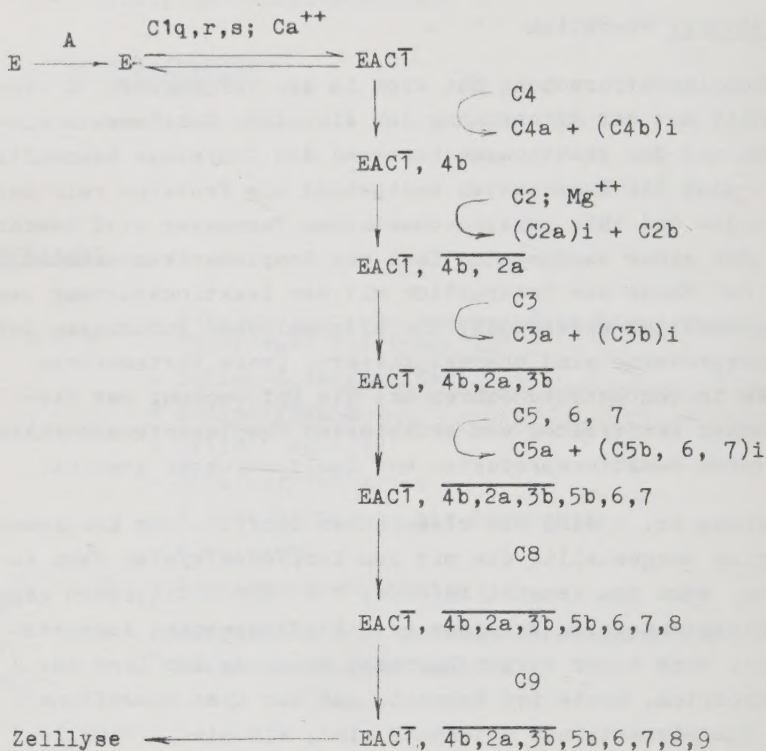
Einleitung: Überblick

Die Komplementforschung hat sich in den vergangenen 10 Jahren intensiv mit der Erforschung der einzelnen Komplementkomponenten und den Reaktionsmechanismen des C-Systems beschäftigt. Heute sind die Komponenten weitgehend als Proteine rein darzustellen und ihre physiko-chemischen Parameter sind beschrieben. Bei einer zunehmenden Zahl von Komplementkomponenten ist auch der Modus der Interaktion mit dem Reaktionspartner reaktionskinetisch untersucht, die biochemischen Änderungen der Partnerproteine sind charakterisiert. Große Fortschritte gerade in den letzten Jahren hat die Erforschung der biologischen Aktivitäten von aktivierten Komplementkomponenten und deren Reaktionsprodukten und Spaltprodukten gemacht.

Im Schema Nr. 1 sind die klassischen Schritte der Komplementreaktion dargestellt, die mit dem Komplementsystem dann ablaufen, wenn ihm sensibilisierte, d.h. mit Antikörpern gegen Erythrozytenmembran beladene rote Blutkörperchen zugesetzt werden: Nach einer kurzen Lagphase kommt es zur Lyse der Erythrozyten. Heute ist bekannt, daß zur Lyse mindestens neun Einzelreaktionen notwendig sind, wie sie in Tabelle 1 dargestellt sind. Es reagieren dabei die in nicht aktiver Form im Serum vorliegenden Komplementfaktoren jeweils mit dem vorausgehenden Intermediärprodukt. Diese Intermediärprodukte, z.B. $\text{EAC}\bar{1}$, $\text{EAC}\bar{1}4$ bzw. $\text{EAC}4$, $\text{EAC}\bar{1}4\bar{2}$ und zum Teil auch die späteren Intermediärprodukte können in definierter Form dargestellt werden; ein großer Teil der Einzelschritte ist in Bezug auf die Art der biochemischen Interaktion, der Reaktionskinetik, die Parameter der Reaktion sowie in Bezug auf Einfluß von Aktivatoren und Inhibitoren gut charakterisiert. Genauere Angaben sind in den Übersichtsartikeln von (8, 12, 15) zusammengestellt.

Tabelle 1:

Reaktionsschritte der Komplementreaktion



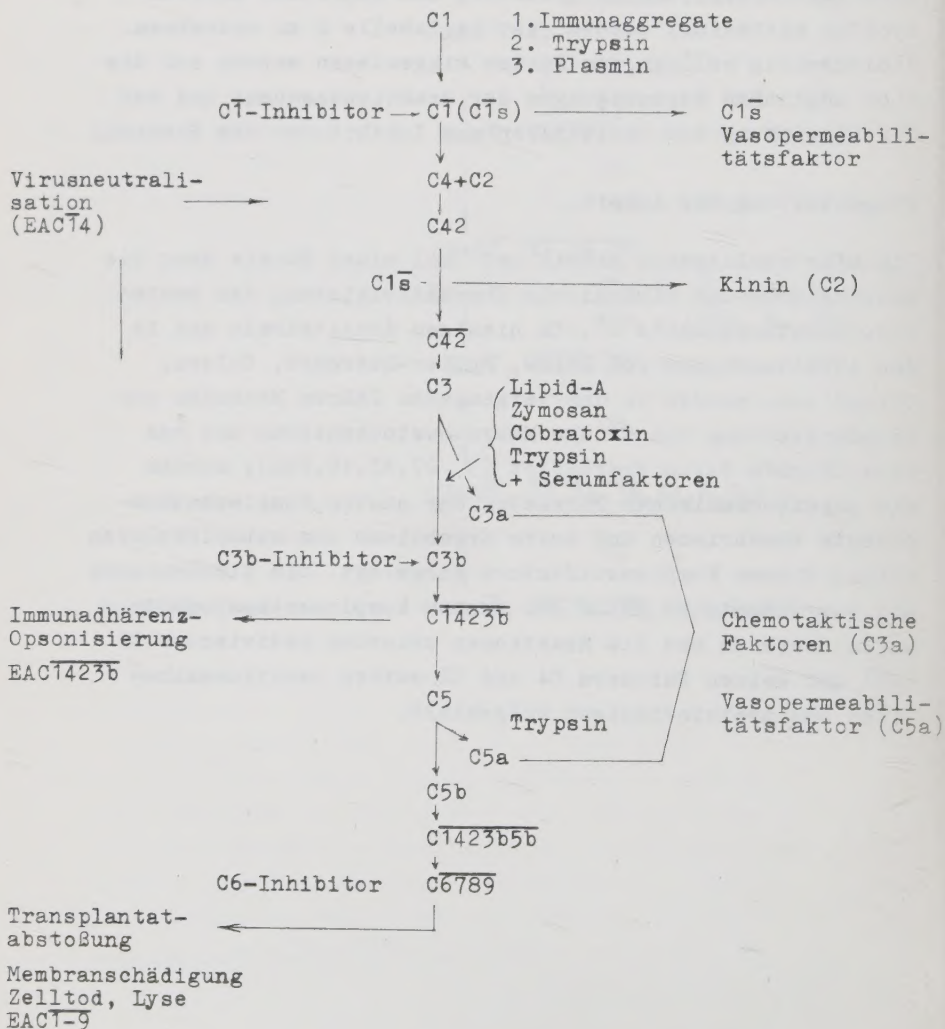
Die Komplementreaktion am sensibilisierten Erythrozyten ist der am besten studierte Reaktionsablauf. Einzelschritte dieser Kaskade und auch der volle Ablauf des Systems können aber nicht nur durch Antigen-Antikörper-Komplexe ausgelöst werden, sondern auch durch sonstige biologische Reaktionen, z.B. im Rahmen der Blutgerinnung. Eine Übersicht über biologische Aktivitäten, die durch Komplementfaktoren entweder an Zelloberflächen oder durch Entstehen von vasoaktiven, chemotaktischen, anaphylaktischen und ähnlichen aktiven Stoffen mitbedingt werden, ist in Tabelle 2 zu entnehmen. Gleichzeitig soll in dem Schema hingewiesen werden auf die noch möglichen Verzweigungen der Reaktionssequenz und auf die Einwirkung von Aktivatoren und Inhibitoren des Systems.

Fragestellung der Arbeit

Die hier vorliegende Arbeit ist Teil einer Studie über die biochemische und biologische Charakterisierung der ersten Komplementkomponente $C\bar{1}$. Im hiesigen Arbeitskreis und in den Arbeitsgruppen von Lepow, Müller-Eberhard, Colten, Stroud u.a. wurden in den vergangenen Jahren Methoden zur Reindarstellung von $C1$ aus Meerschweinchen Serum und aus menschlichem Serum erarbeitet (9, 27, 33, 16, 29a); wurden die physikochemischen Parameter der ersten Komplementkomponente beschrieben und erste Ergebnisse zum submolekularen Aufbau dieses Komplementfaktors vorgelegt. Die biochemische und enzymchemische Natur der ersten Komplementkomponente wurde bewiesen und die Reaktionen zwischen aktiviertem $C1$ ($C\bar{1}$) und seinen Partnern $C4$ und $C2$ wurden reaktionskinetisch und proteinchemisch aufgeklärt.

Übersicht über Effekte der Komponenten-Aktivierung
bei der C-Bindung, sowie deren Inhibitoren und
Aktivatoren

	Inhibitoren d. Komplementsyst.	Aktivatoren d. Komplementsyst.	
Aktivitäten an d. Zelloberfl.			Durch Spaltpro- dukte entstehen- de biologische Aktivitäten



Im ersten Teil der Arbeit, in einer kurzen Literaturübersicht, werden die Befunde über

die Reindarstellung und physikochemische Charakterisierung von C1,

die verschiedenen möglichen Reaktionen des Moleküls mit Immunglobulinen,

mit C4 und C2 und mit dem C1-Inhibitor,

und die vorliegenden Befunde über den submolekularen Aufbau von C1

zusammengetragen. Die eigenen experimentellen Arbeiten sind eine Fortsetzung von Untersuchungen des riesigen Arbeitskreises über den submolekularen Aufbau von C1.

Ziel dieser Untersuchungen war es, das Verhalten von gereinigtem C1 und dessen Dissoziationsprodukten in der Polyacrylamid- Elektrophorese zu beschreiben und zu charakterisieren.

Literaturübersicht:

1. Vorkommen von C1

C1 kommt im Serum aller Warmblütler vor. Im menschlichen Serum beträgt die C1-Konzentration $2-4 \times 10^{13}$ effektive Moleküle C1 pro ml; der C1-Proteingehalt beläuft sich hierbei auf 200 bis 300 ug, wobei für die C1q Untereinponente 100 bis 200 ug/ml und für C1s 22 ug/ml ermittelt werden. Für humanes C1r sowie für den C1-Proteingehalt beim Meerschweinchen stehen die Daten noch aus (32, 15).

2. Nachweismethoden

- a) C1 kann aufgrund seiner hämolytischen Aktivität in der Lyse von sensibilisierten Erythrozyten gemessen werden: Reaktionspartner sind EA und EAC4, an die sich C1 anlagert. Hierbei ist C1 der limitierende Faktor, während alle übrigen Komponente im Überschuß hineingegeben werden.

Im einzelnen muß dabei die Reaktion so gesteuert werden, z.B. mit EAC4, daß pro Erythrozyt ca. 100 oder mehr C4-sites, d.h. Rezeptorzellen für C1 vorhanden sind und daß nur etwa ein C1-Molekül pro Erythrozyt im Reaktionsansatz vorhanden ist. In der gewählten Reaktionszeit müssen alle C1-Moleküle stabil an EAC4-Zellen gebunden werden. Mit statistischen Methoden läßt sich dann die Zahl der C1-Moleküle im Reaktionsansatz errechnen, wenn als zweite Reaktionsbedingung gewährleistet ist, daß alle entstehenden EAC14-sites mit Hilfe eines Überschusses der Komplementfaktoren C2, C3, C5 und aller anderen später bis zur lytischen site EAC1-9 reagierende Komponenten entwickelt wird. Dieses Meßverfahren wird Molekular Titration genannt und ist im einzelnen bei (25) beschrieben.

- b) Die C1 Unterkomponenten können mit quantitativen Methoden der Immunpräzipitation (u.a. Überwanderungselektrophorese) und der Manzini-Technik (14) auf proteinchemischer Basis nachgewiesen werden. Diese Möglichkeit wird heute zur Bestimmung der C1q- und der C1s-Subkomponenten verwendet.
- c) C1q kann außerdem durch seine Eigenschaft, Immunglobulin-Aggregate bzw. Latex-Partikel, die mit Immunglobulin beladen sind, zur Agglutination zu bringen, nachgewiesen werden (5, 16).
- d) C1s kann nach Aktivierung zu C1 $\bar{s}$ (C1- Esterase) durch seine esterolytische Aktivität gegenüber TAME (Meerschweinchen-C1 $\bar{s}$) bzw. ATE (Human-C1 $\bar{s}$) nachgewiesen werden (1, 23a).

3. Reindarstellung

- a) Eine Übersicht über die verschiedenen Methoden zur Reindarstellung von C1 als makromolekularen Komplex wurde in der Dissertation von Wunderlich (33) gegeben.

- b) Die Unterkomponenten von C1, C1q, C1s und C1r, können dargestellt werden, indem man makromolekulares C1 mit EDTA behandelt und die dadurch entstehenden Spaltprodukte durch Chromatographie an DEAE-Zellulose voneinander trennt (9, 27).
- c) C1q wurde von Stroud et al. (4, 28, 3) durch mehrfaches Präzipitieren der Euglobulinfraktion aus Serum rein dargestellt.
- d) C1s wurde von Nagaki und Sakai et al. rein dargestellt (18, 26).

4. Physikochemische Parameter von C $\bar{1}$

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Autoren und die bisher vorliegenden Untersuchungsbefunde über die physikochemischen Parameter von C $\bar{1}$.

Tab. 3

Physikocnemische Parameter der ersten
Komplement-Komponente
(Literaturübersicht)

Art	MG	PAA-Elektrophorese	Bemerkung	Literatur
<u>Standard</u>				
C1	1,1 Mill.		natives C1 C1 nach Re- assoziaton aus C1q,C1r,C1s	Naff,Pensky, Lepow (17) " "
CT		a und B 3 Untereinheiten		Bing (1971) (3)
Meer- schwein- chen				Mayer,Nelson (13)
CT	19S	3 hämolytisch aktive Banden	2 Untereinhei- ten im Serum 12 Monomere 5 Untereinhei- ten	Nishioka (20) Tamara,Nelson (19) Wunderlich (33) Opferkuch (21)
C1q	390 000		C1q aus Serum- EDTA C1q	Naff,Pensky, Lepow (17) Polly,Shelton, Svehag (22, 29)
C1r	168 000	B-Globulin	Sephadex G200 Reinigung über CM-Zellulose und PAA	de Braco,Stroud(4)
C1s	110 000	a	2 Untereinhei- ten durch enzy- matische Trennung	Nagaki-Stroud (18) Taubmann,Lepow (3)
C1s		wandert lang- samer als C1s		Nagaki-Stroud (18)

Aktiviertes C1: Kommentar zur Tabelle 3

Als Molekulargewicht für C1 wird allgemein ca. 1 Million angenommen. Dieses Molekulargewicht trifft nur für teilgereinigtes C1 zu, welches durch Präzipitation bei Anwendung von niedriger Ionenstärke erzielt wird. Inwieweit natives und inaktives C1 im Serum mit einem Molekulargewicht von 1,1 Millionen vorliegt oder ob Serum-C1 mit niedrigerem Molekulargewicht vorliegt, ist noch kontrovers. Experimentell gesichert ist, daß C1 sehr leicht, z.B. durch Behandlung mit EDTA oder in Puffern hoher Ionenstärke dissoziiert und daß hämolytisch aktives C1 auch in Fraktionen mit erheblich kleinerem Molekulargewicht als 1 Million existiert (33).

C1q konnte in seiner chemischen Zusammensetzung von Yonemasu und Stroud (35) charakterisiert werden. So beträgt der Stickstoffanteil 13,2% und der Anteil des Kohlehydrats 7,2%. Der Extinktionskoeffizient ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) war 6 bis 6,5. Außergewöhnlich für ein Serumprotein ist, daß C1q die Aminosäuren Hydroxyprolin und Hydroxylysin sowie einen auffallend großen Anteil von Glycin und Prolin enthält. Diese Zusammensetzung ähnelt dem Aufbau des Kollagen. Die Beobachtung, daß Glucose und Galactose in relativ großen äquimolaren Mengen vorhanden ist und der hohe Anteil von Hydroxylysin lassen vermuten, daß C1q Einheiten enthält, die auch in der Basalmembran von Gefäßen anzutreffen sind.

Nachdem Naff und Ratnoff (1968) C1r teilweise reinigen konnten, gelang es Bracco und Stroud (4), C1r vollständig rein darzustellen. C1r wurde elektrophoretisch in der PAA bei pH 8, 6 als β -Globulin charakterisiert; es hat ein Molekulargewicht von 168 000.

C1s, von Haines und Lepow 1964 dargestellt, hat ein MG von 110 000 und unterscheidet sich in seiner physikochemischen Zusammensetzung von C1s (Nagaki, Stroud 1970) (18). Der Befund, daß C1s von Trypsin und Plasmin gespalten wird, (Ratnoff und Naff 1967) (23) läßt darauf schließen, daß C1r ein Enzym ist und C1s enzymatisch aktiviert.

5. Reaktionswege von C1

- a) Im Serum liegt C1 in nicht aktiver Form vor. Als Erkennungseinheit und funktionelle Verbindung zwischen dem Komplementsystem und den Immunglobulinen, besonders IgG und IgM, dient C1q. Der Rezeptor bei den Immunglobulinen befindet sich auf dem Fc Stück (Ishizaka) (5a), der beim freien, nativen Antikörper behindert und dadurch unwirksam ist. Erst durch eine Konformationsänderung im Antikörpermolekül, wie sie z.B. bei der Bindung an das Antigen erfolgt, wird der Rezeptor frei und damit fähig, Komplement zu binden.

Die Anlagerung von C1 an "aktiviertes" Ig ist sehr stark von der Ionenstärke des Milieus (stabil bei niedriger, locker bei hoher Ionenstärke (Borsos und Rapp) (4a) und von der Temperatur abhängig (Tamura und Nelson) (29a).

Für die Anlagerung von C1 an den Immunkomplex sind Ca-Ionen erforderlich.

Die nun an den Ag-Ak-Komplex gebundene inaktive erste Komplementkomponente ist aber erst dann in der Lage mit C4 und C2 zu reagieren, wenn C1 aktiviert worden ist. Über den Mechanismus des Aktivierungsprozesses ist aber bisher noch wenig bekannt. Ein wichtiger Schritt scheint hierbei die Umwandlung von C1s zu C1s zu sein, der durch die als Protease wirksame Untereinheit C1r bewerkstelligt wird. Dieser Schritt erfordert wahrscheinlich die Aktivierung von C1r zu C1r (22a).

Solche Reaktionsschritte allein erklären aber nicht die experimentellen Befunde über die Aktivierungsreaktion von C1 ausreichend. Möglicherweise ist eine intramolekulare Umlagerung der Subkomponenten oder erst der Aufbau des Makromolekülkomplexes aus den Subkomponenten am Rezeptor-Immunglobulin bei der Aktivierungsreaktion mit beteiligt (24).

Aber auch in Abwesenheit von Ag-Ak-Komplexen kann eine Aktivierung von C1 zu C1 $\bar{T}$ erfolgen.

So ergab die Reinigung von humanem- und Meerschweinchen C1 durch Präzipitation, Chromatographie und Gel-Filtration Präparationen von C1 $\bar{T}$ (Lepow et al) (9).

Weitere Aufschlüsse über den Aktivierungsprozeß von C1 ergaben die Versuche mit verschiedenen Inhibitoren der hämolytischen Aktivität von C1 $\bar{T}$.

Durch Behandlung mit EDTA und Erhöhung der Ionenstärke kann man das C1-Molekül reversibel spalten und so die Umwandlung von C1 zu C1 $\bar{T}$ verhindern (Colton) (4b).

Weiter kann man die hämolytische Aktivität C1 $\bar{T}$ durch Carrageen (Davis) (4c) dadurch unterbinden, daß sich die Komplementkomponente nicht an den Ag-Ak-Komplex anlagert (Borsos et al.). Carrageen kann jedoch die Esterase-Aktivität von C1 $\bar{T}$ nicht verhindern. Hieraus kann man schließen, daß die Struktur, die C1 $\bar{T}$ an den Ag-Ak-Komplex bindet, sich von der Struktur unterscheidet, die die enzymatische Aktivität beinhaltet (Becker) (1).

Im Serum von Kaninchen, Meerschweinchen und Menschen kommt der C1-Esterase Inhibitor vor. Humaner C1-Esterase Inhibitor blockiert die Aktivität von C1 $\bar{T}$ und C1s. Dieser Faktor hat auch klinische Bedeutung, so z.B. beim hereditären, angioneurotischem Ödem (Donaldson - 1963).

Mit Hilfe zweier Inhibitoren, und zwar C1 $\bar{T}$ -Inhibitor und Sp54 (pentosan-poly-sulfo-ester) war es möglich, einen Aktivierungsschritt im C1-Molekül nachzuweisen, der vor Erscheinen der C1 $\bar{T}$ -Aktivität abläuft (11). Schematisch sieht danach der Schritt von C1 zu C1 $\bar{T}$ wie folgt aus: Ag-Ak + C1qrs $\longrightarrow$ Ag-Ak C1qrs $\longrightarrow$ Ag-Ak C1 $\bar{q}$ rs $\longrightarrow$ Ag-Ak C1 $\bar{q}$ rs $\longrightarrow$ Ag-Ak C1 $\bar{q}$ rs $\longrightarrow$ hämolytisch aktiv gegenüber C4 und C2.

Aktiviertes C1 in flüssiger Phase oder gebunden als EAC $\bar{T}$ und niedermolekulares C $\bar{T}$ s können natives C4 proteolytisch spalten und zwar in die Proteine C4a und C4b. Findet die Reaktion an der Zelloberfläche statt, so entstehen C4-sites, d.h. das Spaltprodukt C4b wird an der Zelloberfläche in der Umgebung des Immunglobulins und des fixierten C1-Moleküls gebunden. In gleicher Form wird C2 durch aktiviertes C $\bar{T}$ bzw. C1-Esterase gespalten; die Spaltreaktion bzw. die C2-site Bildung verläuft aber erheblich schneller, wenn C2 im Komplex mit C4 vorliegt.

6. Submolekularer Aufbau von C1

Ionen-

Bei der Austausch-Chromatographie und von Euglobulin-Fraktionen in EDTA-haltigen Puffern verschwindet die hämolytische C1-Aktivität. Nach Rekalzifizierung der Eluate ergab die Kombination von 3 verschiedenen Chromatogramm -Pools wieder hämolytisch aktives C1. Die 3 aktiven Fraktionen wurden als C1q, C1r und C1s bezeichnet. Die Kinetik der Dissoziation und Reassoziatio n wurde untersucht (27).

- b) Durch eine Kombination von verschiedenen Inaktivierungsverfahren und Auftrennung von C1-Präparaten und durch die Rekombination der so gewonnenen Fraktionen postulierte Opferkuch (21) zumindest 5 Subkomponenten, die für die Hämolysefunktion C1 bereitstehen müssen.
- c) Bei den Untersuchungen über das Verhalten von teilgereinigten C1-Präparaten bei der Ultrazentrifugation ergab sich, daß in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Puffers hämolytisches C1 verschieden schnell sedimentiert (33). Die Dissoziation von makromolekulärem C1 in Puffern steigender Ionenstärke in Untereinheiten, mit fallenden Sedimentationskonstanten, wurden durch die Studien von Colten et al. bestätigt (4b). Die Dissoziationsprodukte von C1, die mit ansteigender Ionenstärke des Puffers erhalten werden, sind nicht mit den Sub-

komponenten C1q, C1r und C1s identisch. Der Einfluß von anderen Parametern, wie pH, Eiweißkonzentration und Calcium-Ionengehalt des Puffers auf die Salzkonzentration-abhängige Spaltung von C1 wurde untersucht. Sassano et al. (27) studierten die Kinetik und die Ausbeute bei der Reassoziaton der Untereinheiten.

- 3) Aufschlüsse über den submolekularen Aufbau von C1q (MG 388 000) ergaben die Arbeiten von Stroud et al. (36). Milde Reduktion und Alkylierung ergaben zwei Untereinheiten mit dem MG von ca. 220 000 bzw. 150 000, Behandlung von C1q mit Urea und Jodacetamid erbrachte die Aufspaltung von kleineren Untereinheiten mit dem MG von ca. 70 000 bzw. 50 000. Bei noch stärkerer Reduktion und Alkylierung konnten Stroud und Yonemasu (36) Untereinheiten mit dem MG von 20 - 40 000 nachweisen. Bezüglich der Ultrastruktur postulieren dieselben Autoren ein C1-Molekül, das aus einer noch unbestimmten Zahl von Untereinheiten besteht, die einen Durchmesser von 65 - 70 Å aufweisen. Diese Untereinheiten sind mit einer zentralen Struktur durch fibrillenartige Gebilde verbunden, die 60 - 100 Å lang und 15 - 20 Å sind. Die Autoren nehmen an, daß die zentrale Struktur weniger dick ist als die Untereinheiten und daß der Durchmesser des Gesamt-moleküls 300 - 400 Å beträgt. Diese ähnlichen Befunde ergeben sich auch aus Untersuchungen von Svehaug und Bloth (1970). Darüberhinaus weist Polley (22) in ihren Untersuchungen darauf hin, daß das native C1q aus einem scheibenförmigen Knäuel besteht, mit sechs Untereinheiten, und welches im Stande ist, sich zu einer Linearstruktur mit der identischen Zahl von Untereinheiten zu entfalten.

Zur gleichen Zeit gelang es Stroud, Polley und Svehaug, erste elektronenoptische Aufnahmen von C1q vorzulegen (29).

7. Substrukturformel für makromolekulares C1

Die Annahme, daß C1q, C1r und C1s Subkomponenten des makromolekulären C1 sind, ist wohl begründet. Wunderlich (33) und Ringelmann (24) haben darauf hingewiesen, daß die Summe der Molekulargewichte von C1q (388 000), C1r (168 000) und C1s (110 000) nicht das Molekulargewicht von 1,1 Millionen sondern nur etwa 660 000 ergibt: Es müssen also im C1-Komplex entweder einzelne der genannten Subkomponenten mehrfach vorkommen oder noch unbekannte Subkomponenten darin eingebaut sein. Die Befunde über eine in mehreren Stufen ablaufende Aktivierungsreaktion, sichtbar an der stufenweisen Zunahme der C4-Inaktivierungs-Fähigkeit und der TAME-Spaltungs-Aktivität, lassen uns vermuten, daß die C1s-Untereinheit mehrfach im Molekülverband enthalten ist, zumindest 3 oder 4 C1s-Komplexe eingebaut sind. Ein zweiter Hinweis für diese Annahme sind die Messungen über das Verhältnis zwischen C4-inaktivierender Fähigkeit, C1-Hämolyse-Aktivität und TAME-spaltender Fähigkeit bei C1-Präparaten, die auf verschiedenen Wegen gereinigt wurden. Auch Müller-Eberhard legte kürzlich Befunde vor, die in die Richtung weisen, daß mehrere C1s-Untereinheiten im Molekülverband vorhanden sind.

Experimentelle Ergebnisse

1. Verhalten von gereinigtem C1 bei der Elektrophorese auf Polyacrylamid-Elektrophorese.

Diese Versuchsreihe wurde unter dem Aspekt durchgeführt, festzustellen, ob das nach der Methode von Wunderlich und Ringelmann (32) gereinigte C1 etwaige Kontaminanten mit sich führt. Außerdem wurde der Frage nach der Zahl der aktiven, hämolytischen Banden nachgegangen.

MS-Serum

Euglobulinfraktion

Gereinigtes C1

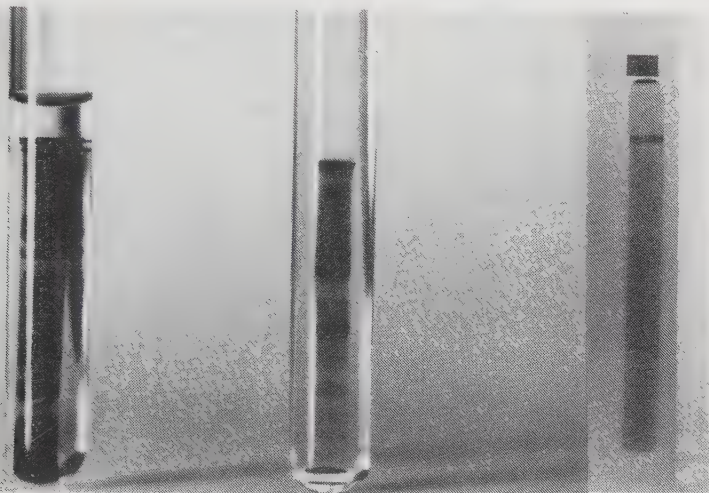


Abb. 1: Vergleichender Auftrag von Serum, Euglobulinfraktion und gereinigtes C1 auf der PAA. Die gereinigte C1-Lösung hatte hierbei eine OD von 0,865 (bei $260m_{\mu}$, 1 cm Schichtdicke) und eine Konzentration von $1,9 \times 10^{12}$ e.M./ml. Laufzeit 40 min. bei 40 Amp/Röhrchen.

Abbildung 1 zeigt, daß das native Meerschweinchen C1 nach einer Laufzeit von 40 min. in drei Farbbanden aufgeteilt wurde, wobei ein Eiweißanteil nicht in das

Gel hineinwandert, während die zweite Bande etwa 1 cm in die Säule hineinwanderte und als deutliche, etwas unscharf begrenzte Linie sichtbar wurde.

Wie groß der Betrag an Eiweiß in den einzelnen Banden ist, gibt Abbildung 2 wieder, in der der Extinktionsverlauf (280 nm) einer PAA-Säule dargestellt ist.

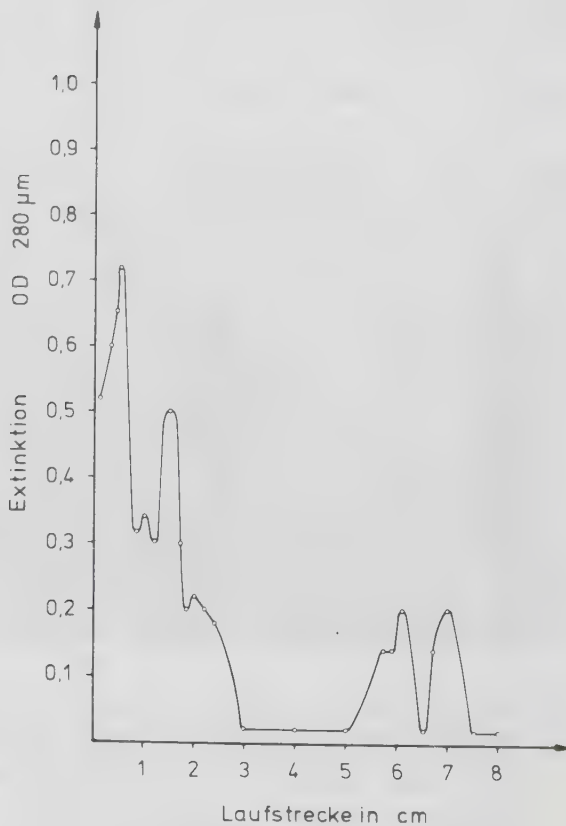


Abb. 2: Darstellung des Eiweißanteils der einzelnen Banden. Die Extinktion der Farbbande des PAA-Gels wurde bei 280 nm gemessen.

Es ergab sich nun die Frage, welche von diesen dargestellten Banden hämolytische Aktivität aufweist.

Dazu wurde die Säule mit Hilfe von Kohlensäureschnee schnell gefroren, in Segmente geschnitten und C1 aus dem Gel eluiert.

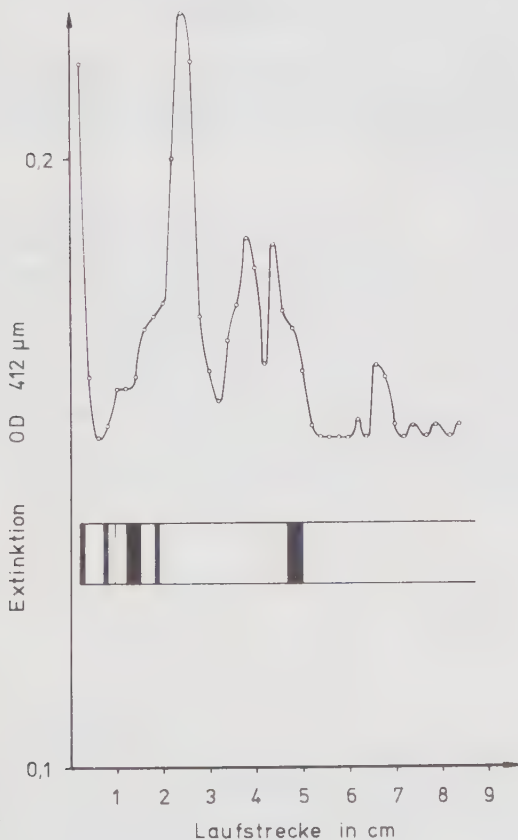


Abb. 3: Darstellung der hämolytischen Cl^- -Aktivität der Banden. Auf der Ordinate ist die Extinktion des Haemolyseansatzes mit dem Eluat aus dem jeweiligen Sektor des PAA-Gels angegeben.

Aus diesem Versuch ist zu ersehen, daß außer der ersten hochmolekularen Bande, die anderen beiden Banden mit hohem Eiweißanteil keine Aktivitäten aufweisen, sondern daß eher die niedermolekularen Anteile zur hämolytischen Aktivität befähigt sind. Aus dem Versuch ergab sich weiterhin, daß durch das Gefrieren der PAA-Säule mit Hilfe des Konlesäureschnees C1 eine starke Inaktivierung erfahren hat; das Eluat führt in keinem Ansatz zu einer vollständigen Lyse der EAC4-Zellen des Testes.

.. Verhalten von gereinigtem C1 bei der Elektrophorese auf PAA-Gel nach Vorbehandlung der C1-Lösung mit Puffern höherer Salzkonzentration

Dieser Versuch basiert auf den Befunden von Wunderlich über den Einfluß der Ionenstärke auf das Molekulargewicht von C1 (33). Aus diesen folgt, daß das höchste Molekulargewicht bei der Ionenstärke von 0,065 erreicht wird, das niedrigste MG bei 0,9 Ionenstärke. Durch die Vorbehandlung einer C1-Präparation in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke sollten C1-Aggregate verschiedener Größe erreicht werden. Hinzu kam die Frage, ob die verschiedenen großen Aggregate mit der PAA sichtbar gemacht werden können.

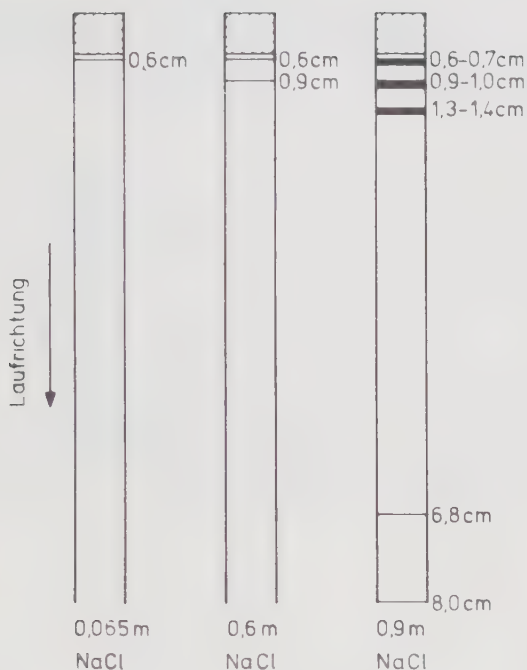


Abb. 4: C1 wurde jeweils 30 min. in Puffern verschiedener Salzkonzentration vorbehandelt. Laufzeit: 45 min. bei 40 A/Röhrchen.

Aus dieser Abbildung 4 ist nun ersichtlich, daß durch die Vorbehandlung von C1 mit 0,065 m NaCl eine hochmolekulare Eiweißbande zur Darstellung kommt, die sich mit steigender

Ionenstärke - hier 0,6 m sowie 0,9 m NaCl - in eine bzw. zwei weitere Banden aufspaltet. Hinzu kommen zwei zusätzliche niedermolekulare Banden bei der Ionenstärke von 0,9 m NaCl, die aus der ursprünglich zweiten Banden entstanden sind, wie wir sie bei dem Auftrag von unbehandeltem C1 erhalten haben.

3. Verhalten von gereinigtem C1 bei der Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gel nach Vorbehandlung mit EDTA-haltigen Puffern

Wie ebenfalls aus der Literatur und eigenen Versuchen bekannt, zerfällt humanes C1 in EDTA-haltigen Puffern in C1q, C1s und C1r. C1 vom Meerschweinchen, wie es bei diesem Versuch verwendet wurde, zeigt nicht identisches Verhalten wie C1-human; es verliert nicht vollkommen die hämolytische Aktivität, wird aber durch EDTA auch langsamer sedimentierende Fraktionen zerlegt. Erst durch Kombinationen von höherer Ionenstärke und EDTA ist bei Meerschweinchen-C1 nach den Untersuchungen von Lepow, Müller-Eberhard und Sassano die Dissoziation in C1q, C1r und C1s zu erreichen (27).

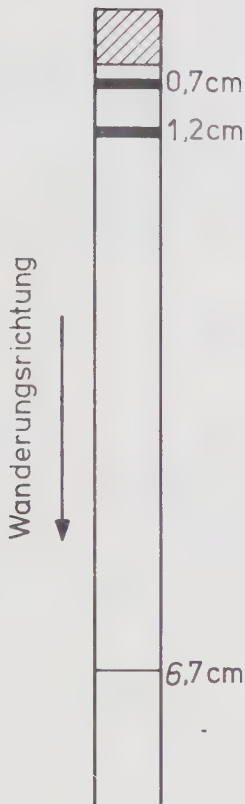


Abb. 5: Auftrag von C1 auf der PAA nach 30-minütiger Vorbehandlung in 0,01 m EDTA-Puffer. Laufzeit 45 min. bei 40 A/Röhrchen

Ziel dieses Versuches war die Darstellung verschieden großer Eiweißfraktionen auf der PAA nach Vorbehandlung von C1 in 0,01 m EDTA.

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, ergeben sich dabei drei, scharf begrenzte Banden.

Vergleichend zu dem vorausgegangenen Versuch, in dem C1 in 0,9 m NaCl vorbehandelt wurde, kann Folgendes gesagt werden: Die beiden niedermolekularen Banden, die bei C1 in 0,9 m NaCl zur Darstellung gebracht werden konnten, konnten nicht mehr nachgewiesen werden. Proteinmessungen in den einzelnen Fraktionen ergaben, daß die im vorherigen Versuch nachweisbaren drei hochmolekularen Fraktionen eine Verminderung ihres Eiweißanteiles erfahren haben und schneller in der PAA wanderten.

4. Verhalten von vorbehandeltem C1 unter dem Einfluß längerer Laufzeiten

Mit Hilfe von verlängerten Elektrophoresezeiten wurde hier der Versuch unternommen, ankonzentriertes und mit 0,9 m NaCl bzw. 0,01 m EDTA vorbehandeltes C1 in eine größere Zahl von Banden aufzuspalten. Die Versuche ergaben jedoch, daß das vorbehandelte C1 nicht weiter aufzuspalten war. Die folgende Abbildung verdeutlicht dies an der Laufzeit von über 296 Minuten.

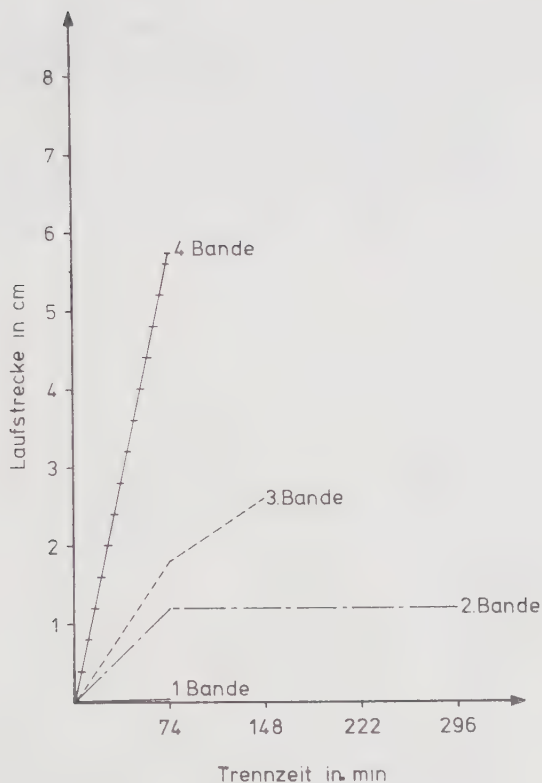


Abb. 6: Einfluß längerer Laufzeiten auf C1, das 30 min. in 0,9 m NaCl vorbehandelt wurde.

Ein solcher Versuch wurde auch mit C1 unternommen, das mit 0,01 m EDTA behandelt wurde und eine Elektrophorese-dauer von 250 Minuten hatte. Aus Abbildung 7 ist ersichtlich, daß eine hochmolekulare Bande nicht auf der Gel-säule liegen blieb, sondern in das Gel hineingewandert ist.

Auch Bande 2 lief mit fortschreitender Laufzeit weiter in die Gelsäule hinein.

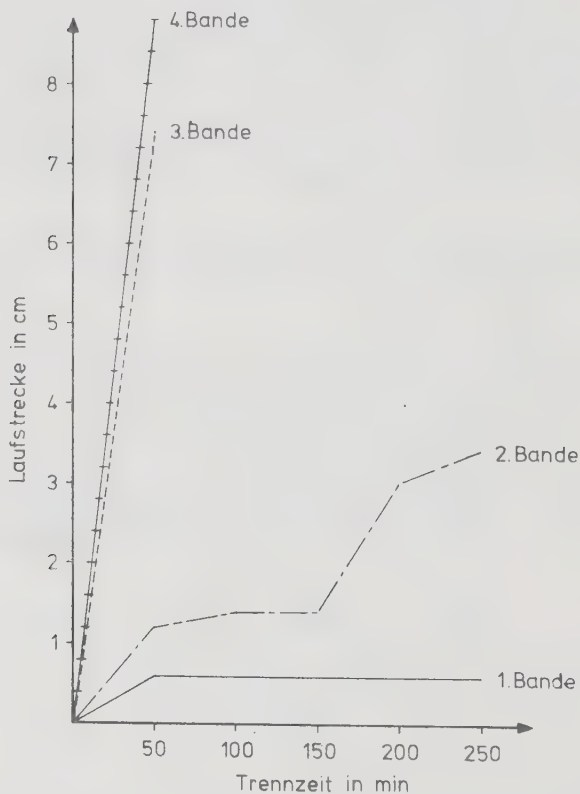


Abb. 7: Einfluss längerer Laufzeiten auf C1, das 30 min. in 0,01 m EDTA-Puffer vorbehandelt wurde. Laufzeit richtete sich nach dem Erreichen des Farb-indikators 1 cm vor Ende der PAA-Säule.

5. Das Verhalten von 0,9 m NaCl vorbehandeltem C1 bei der Elektrophorese auf PAA unter verschiedenen Temperaturen

In diesem Versuch (Abbildung 8) wurde C1 in einem Puffer von der Salzkonzentration 0,9 m vorbehandelt und jeweils bei 45° C, 55° C oder 65° C erhitzt. Aus der graphischen Darstellung ist ersichtlich, daß sich die mittlere Bande bei 65° C in zwei Fraktionen aufgelöst hat. Neben der weiter daraus zu ersiehenden Aggregation von C1 und der resultierenden verminderten Wanderungsgeschwindigkeit, ist kein weiterer Einfluß der Temperaturvorbehandlung zu ersehen.

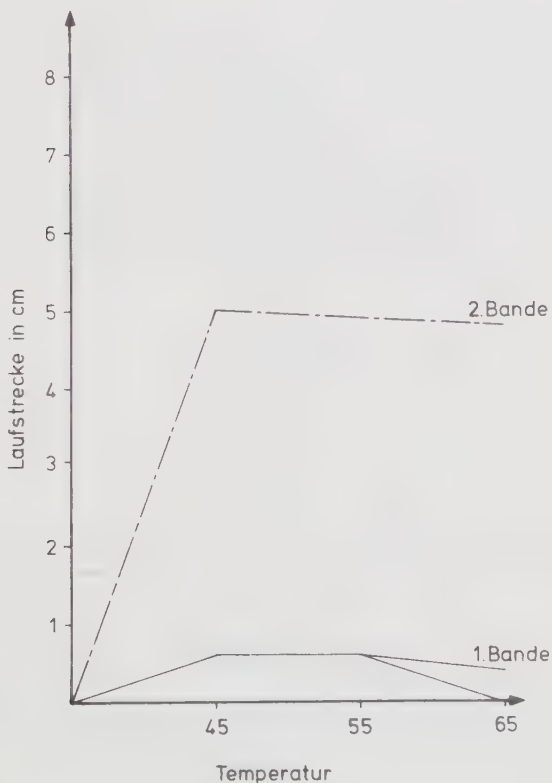


Abb. 8: C1 wurde 30 min. mit 0,9 m NaCl vorbehandelt und jeweils in Wasserbäder von 45° C, 55° C und 65° C erhitzt. Die Laufzeit beträgt 45 Minuten, 40 A/Röhrchen.

6. Das Verhalten von C1 auf der Polyacrylamid-Elektrophorese nach Vorbehandlung mit Harnstoff

In diesem Versuch (Abbildung 9) wurde C1 eine halbe Stunde lang mit 8 m Urea vorbehandelt und einer Elektrophoresedauer von drei Stunden unterzogen. Wie die Graphik veranschaulicht, läuft C1 innerhalb einer Stunde in einer einzigen Bande in die Gelsäule hinein; nach dieser Zeit ist C1 nicht mehr nachweisbar.

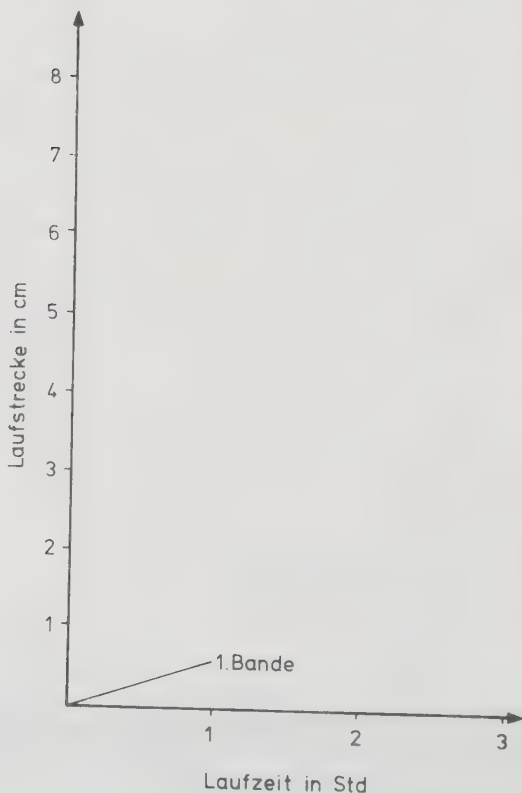


Abb.:9: C1 wurde mit einem 8 m Urea-Puffer 30 Min. vorbehandelt. Die Laufzeit betrug 3 Stunden.

7. Verhalten von C1 auf der Polyacrylamid-Elektrophorese
nach Vorbehandlung mit Harnstoff und SDS

C1 wurde in diesem Versuch eine Stunde lang mit einer Lösung zusammengebracht, die 2% SDS, 8 m Urea und 2% Mercaptoäthanol enthielt. Wie man aus der Abbildung 10 ersehen kann, ist C1 danach in fünf Fraktionen aufgetrennt. Die in den vorangegangenen Versuchen schon mehrmals deutlich gewordene hochmolekulare, auf der PAA liegende Bande ist in die Säule eingewandert. Weiter ist das Auftreten zweier nebeneinander liegender Proteinbanden festzustellen.

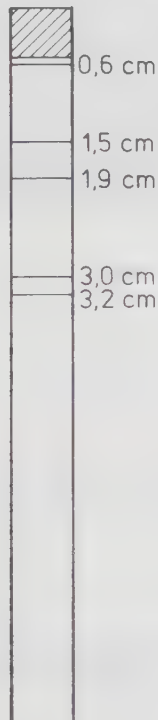
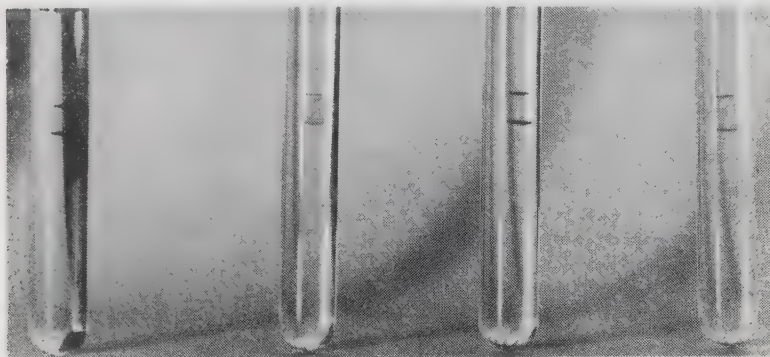


Abb. 10: C1 wurde 30 min. mit einem Puffer vorbehandelt, der 2% SDS, 8 m Urea und 2% Mercaptoäthanol enthielt. Laufzeit 45 Min.

8. Das Verhalten von C1 auf der PAA unter einem veränderten Laufpuffer

In diesem Versuch wurde C1 jeweils mit 0,9 m NaCl, 0,01 m EDTA und mit 6 m Urea vorbehandelt und zur Elektrophorese auf die PAA aufgetragen, wobei der sonst gebräuchliche Laufpuffer, wie er unter Material und Methoden beschrieben ist, 1/100 verdünnt wurde. Das Ergebnis können wir aus Abbildung 11 entnehmen.



C1 C1, 0,9m NaCl C1, 0,09m EDTA C1, 6 m Urea

Abb. 11: Bei diesem Versuch wurde der Laufpuffer 1/100 verdünnt. Die Laufzeit betrug 45 Min. C1 wurde vorher jeweils 30 min. mit 0,9 NaCl, 0,01 m EDTA und 6 m Urea vorbehandelt.

Wie wir ersehen, ergibt sich keine Dissoziation der einzelnen Fraktionen, sondern eine einzig scharf begrenzte Bande, die sich lediglich in der Extinktion unterscheiden, wobei C1 den größten, C1 NaCl den niedrigsten Proteinanteil aufweisen.

9. Bestimmung der Molekulargewichte der einzelnen Banden mit Hilfe von Marker-Proteinen

Aus Abbildung 12 ist die Auftrennung von Aldolase, Chymotrypsinogen, Catalase und Albumin auf die PAA unter den

gleichen Elektrophoresebedingungen ersichtlich, die bei der Auftrennung von C1-Faktoren angewendet wurden. In Tabelle 4 sind die Laufstrecken in Beziehung zum bekannten Molekulargewicht der Substanzen gesetzt. Die Kurve in Abbildung 13 wurde dabei als Eichkurve zur Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine verwendet, die sich bei der Auftrennung von C1 ergeben.

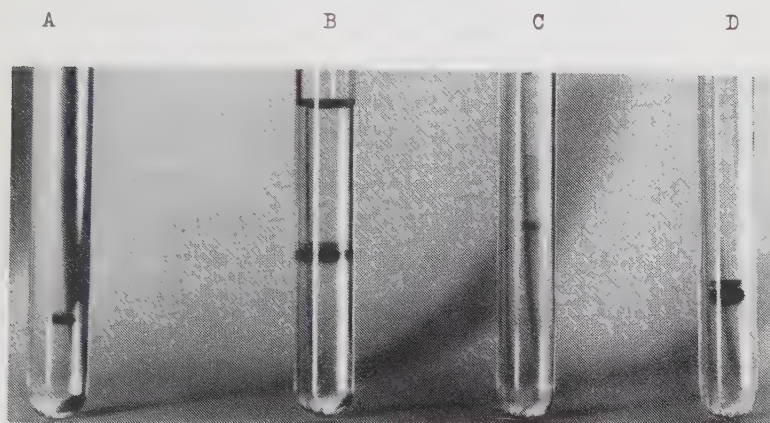


Abb. 12: Darstellung von Chymotrypsinogen (A), Albumin (B), Aldolase (C) und Catalase (D) in der Polyacrylelektrophorese.

Tab. 4: Tabellarische Zusammenfassung des in Abbildung 12 dargestellten Versuches

ENZYM	LAUFSTRECKE	MOLEKULARGEWICHT
Chymotrypsinogen	4,5 cm	25 000
Aldolase	2,3 cm	147 000
Albumin	4,0 cm	45 000
Catalase	1,5 cm	230 000

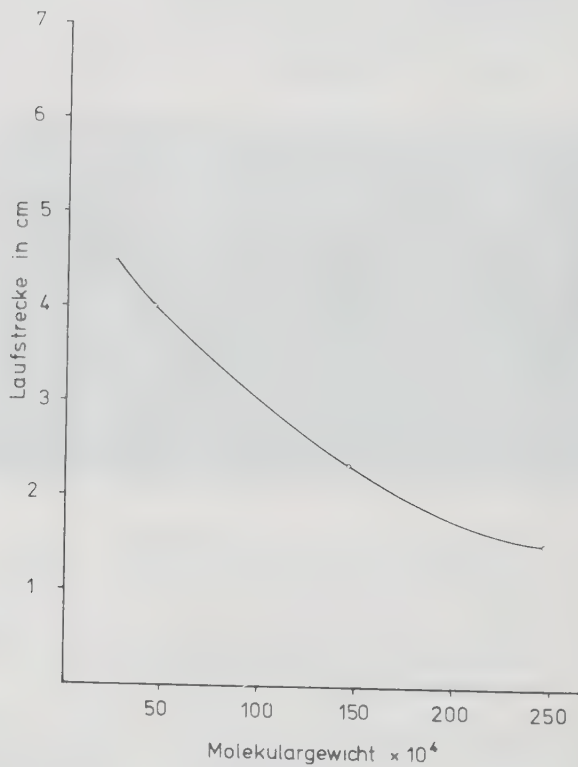


Abb. 13: Darstellung der Laufstrecken verschiedener Marker-Proteine auf der PAA

Diskussion

Ziel der experimentellen Untersuchung war es, durch Vorbehandlung mit verschiedenen Puffern das makromolekulare C1 in niedermolekulare Dissoziationsprodukte aufzutrennen und mit Hilfe der Polyacrylamid-Elektrophorese zur Darstellung zu bringen. Unter Berücksichtigung eigener Befunde und der vorliegenden Literaturdaten anderer Autoren sollte daneben versucht werden, eine Vorstellung über den molekularen Aufbau der ersten Komplementkomponente zu erbringen.

A. C1 und seine Dissoziationsprodukte auf der PAA

Wenn man die Trennbilder der verschiedenen Dissoziationsprodukte gegenüberstellt, so kann man eine gewisse regelmäßige Darstellung von drei Proteinfraktionen erkennen (Tab.5

Tab. 5

Tabellarische Zusammenfassung aller Laufstrecken der vorher beschriebenen Versuche

Laufstrecke mm	C1 rein	C1 - vorbehandelt mit				Bereich des MG
		0,01m EDTA	0,9 NaCl	Urea	Urea + SDS	
10	9	6(8	6/7 9/10	6	6	300 000
		12	13		15	
20					19	250 000
30		32			30 ₃₂	
40						50 000
50						
60	63	67				50 000
70	71	75				
80						
90		88				

In Korrelation zu den Marker Proteinen, würde die

- I. Gruppe ein MG von mehr als 300 000 aufweisen. die
- II. Gruppe ein MG von 100 000 bis 300 000 und die
- III. Gruppe ein MG von unter 50 000.

Aus dem Polyacrylamid-Gel können an mehreren Stellen hämolytisch aktive C1-Fraktionen eluiert werden, die auch zwischen den durch Färbung sichtbar gemachten Proteinbanden zu liegen kommen.

Makromolekulares C1, das in 0,9 m NaCl-Lösung vorbehandelt worden war, und C1 nach Vorbehandlung mit EDTA-Puffern ergab elektrophoretisch jeweils eine Band bei 0,6 cm, 1,2 cm und 3,2 cm. Das Bild ist also im wesentlichen identisch mit dem Elektrophorese-Bild von unbehandeltem C1. Der Grund hierfür mag vielleicht durch eine Dissoziation und Reassoziatioin liegen, verursacht durch den Laufpuffer. Daß dies der Fall sein kann, verdeutlicht der Versuch 8, indem durch Verdünnung des Laufpuffers von 1/100 sich einheitliche Banden von unbehandeltem und behandeltem C1 ergab, die sich lediglich durch die Extinction unterschieden.

Im Gegensatz dazu steht das Trennbild von C1 nach Vorbehandlung mit SDS und Harnstoff. Bei der Elektrophorese enthielt das Polyacrylamid-Gel die gleiche Konzentration an Harnstoff und SDS wie der Puffer, in dem die C1-Präparation vorbehandelt wurde. Neue Proteinbanden bei 1,5 cm, 1,9 cm, bei 3,0 cm und 3,25 cm entstanden.

Die Auftrennung einer makromolekularen reinen C1-Fraktion bestätigte die Beobachtung, daß C1 leicht in kleinere Komponenten zerfällt. Unter den Bedingungen des Lauf- und Elektrophorese-Puffers spalten sich Komponenten mit einem MG von 500 000 bis 40 000 ab.

Das ursprüngliche Ziel der elektrophoretischen Charakterisierung der C1-Unterkomponenten, die durch Behandlung von C1 mit Puffern verschiedener Ionenstärke oder durch Zusatz von

Harnstoff , SDS oder EDTA entstehen, konnte nicht voll erreicht werden. Die Parameter der PAA-Elektrophorese, vor allem der niedermolekulare Laufpuffer, führen möglicherweise zu einer schnellen Reassoziatiön der durch die Vorbehandlung dissoziierten Komponenten.

Die durch die Elektrophorese beobachtete Auftrennung ist also mehr durch die Bedingungen der Elektrophorese als durch die Bedingungen der Vorbehandlung beeinflusst.

Dieselbe Erklärung darf man auch für die Beobachtung über die Elution von verschiedenen hämolytischen aktiven Komponenten aus den Gelsegmenten (siehe Abbildung 3) zugrunde legen.

D. MATERIAL und METHODEN

1. Charakterisierung und Reinigung von C1

Die Reinigungsschritte von C1 werden im Einzelnen von Wunderlich (33), sowie Wunderlich und Ringelmann (32) beschrieben.

Die Tabelle 6 gibt noch einmal den Verlauf einer C1-Reinigung mit Hilfe zweimaliger Zonenzentrifugation wieder. Hierbei werden aus 100 ml Serum die Euglobuline bei pH 6,5 und der Ionenstärke von 0,01 ausgefällt und in 9 ml VBS aufgenommen. Nach Abschleudern der nicht gelösten Bestandteile wurde die Ionenstärke des klaren Überstandes mit 3 m NaCl-Lösung auf 0,6 erhöht und 17 Stunden bei 4° C und 39 000 U/Min. im Zonenrotor zentrifugiert (Ionenstärke des Gradienten $u = 0,6$). Der C1-haltige Pool wurde auf die Ionenstärke $u = 0,065$ umdialysiert, im Diaflow-Gerät von Amicon auf 17 ml eingeengt und ein zweites Mal 16 Stunden bei 4° und 39 000 U/Min. zentrifugiert (Ionenstärke des Gradienten $u = 0,065$).

Alle C1-Präparationen enthalten etwa 4×10^{13} effektive Moleküle C1 pro Milligramm Protein. Das Molekulargewicht beträgt 1 100 000 und ist voll aktiviert. Die Immunpräzipitation mit Antiseren gegen Serum, gegen die Euglobulinfraktion und gegen das gereinigte C1 zeigt nur eine einzige Präzipitatlinie.

Tab. 6 Verlauf einer C1-Reinigung mit Hilfe zweimaliger Zentrifugation (35)

Präparat	eff. Mol. C1 pro ml	Protein mg/ml	Reinigungs- faktor	eff. Mol. C1 pro mg Prot.	Reinigungs- faktor	Proteinmoleküle pro ein eff. C1-Mol. x)
MS-Serum (100 ml)	3 x 10 ¹²	42	-	7,1 x 10 ¹⁰	-	-
Euglobulin-Prak- tion in 0,6m (10,5 ml)	3,5 x 10 ¹⁴	40	10,5	8,8 x 10 ¹²	124	-
U ₂ (10ml Auftrag)					630	
Pool vor der Dialyse 0,6m (285ml)	1,0 x 10 ¹³	0,765	2,9	1,3 x 10 ¹³	0,91	-
U ₂ (Auftrag: 17 ml eingeeigter Pool)					5,6	
Pool I 0,065m (205ml)	3,8 x 10 ¹²	0,094	7,2	4,0 x 10 ¹²	-	14

x) Der Berechnung liegt folgende Annahme zu Grunde: Das C1-Molekül hat unter den Bedingungen, unter denen es im zweiten Ultrazentrifugenlauf zentrifugiert wurde, ein Molekulargewicht von 1,1 Mill. 1 Mol. C1 entsprechend 1,1 x 10²⁵ Protein enthält nach Losschmidt 6,023 x 10²⁵ Moleküle; 1 mg Protein in der Gradientenfraktion enthält dann 5,5 x 10¹⁴ Moleküle.

2. Polyacrylamid-Elektrophorese

a) Substanzen für die PAA

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck Nr. 8382
Tetramethyläthylendiamin	Serva Nr. 35825
Acrylamid	Serva Nr. 10675
N, N-methylen bisacrylamid	Serva Nr. 29195
Riboflavin	Serva Nr. 34350
Ammoniumpersulfat	Serva Nr. 30375
Glycin	Serva Nr. 23394
Amidoschwarz	Serva Nr. 12310
Essigsäure	Merck Nr. 90063

b) Polymerisationslösungen

A. 1 N Hcl 48 ml	B. Acrylamid 28,0 g
Tris 36,6 ml	Bis 0,735 g
Temed 0,23 ml	ad 100
ad 100 ml	
C. 1 N Hcl 48 ml	D. Acrylamid 10,0 g
Tris 5,98 g	Bis 2,5 g
Temed 0,46 ml	ad 100
ad 100	
F. Per 0,14 g	E. Riboflavin 4,0 mg
ad 100	ad 100

Untergel

1 Teil A
 2 Teile C
 1 Teil H₂O

 4 Teile F

 8 Teile 7% Gel

Obergel

1 Teil B
 2 Teile D
 1 Teil E

 4 Teile H₂O

 8 Teile 2,5% Gel

Tris-Glycin-Stammpuffer

6,0 g Tris
 28,8 g Glycin
 Aqua dest. ad 1000 ml
 zum Gebrauch 1 : 10
 mit Aqua dest. ver-
 dünnen

c) Polymerisation

Etwa 1,2 ml 7% Trenngel werden pro Röhrchen eingefüllt, der Überschuß mit der Spitze bis auf gleiches Niveau in allen Säulen abgesaugt, mit Wasser überschichtet und 1 h mit der Fluoreszenzlampe belichtet.

Nach Polymerisation des Untergels und Entfernnens des Wassers werden 0,1 ml 2,5% Obergel pro Röhrchen eingefüllt, mit Wasser überschichtet und ca. 15 Min. mit der Fluoreszenzlampe belichtet.

d) Elektrophorese

Aufgetragen wird eine Proteinmenge von 100 µg. Zur Markierung der Pufferfront werden 3 ml Bromphenolblau in das obere Puffergefäß gegeben. Die Kathode ist oben. Der Strom pro Röhrchen beträgt 5 mA. Die Elektrophorese ist beendet, wenn die Pufferfront bis ca. 1 cm vor das Ende des Röhrchens gelaufen ist.

e) Färben und Entfärben der Gelsäule

Die Gele werden eine Stunde mit Amidoschwarz gefärbt und anschließend 24 Stunden in 7% Essigsäure entfärbt.

3. Hämolytisches Testsystem

a. Komplement-Reagenzien

C-EDTA: Vollkomplement im Verhältnis 1 : 33 mit VBS-EDTA (0,01 m EDTA) verdünnen, vor Gebrauch 10 min. auf 37° erwärmen.

C2: : Die Reinigung wurde von Wagner und Röllinghoff beschrieben (31).

Zellintermediärprodukte: Die Herstellung von E-, EA- und EAC₄-Zellen sind beschrieben.

b. Puffer und Stammlösungen

VBS (Veronal buffered saline) nach Mayer, pH 7, 3;
Ionenstärke 0,15.
Herstellung siehe Anhang.

S-VBS (Veronal buffered saline mit Saccharose) nach
Rapp, pH 7, 3; Ionenstärke 0,065.
Herstellung siehe Anhang

VBS-EDTA (Veronal buffered saline mit 0,01 m EDTA)
pH 7, 3; Ionenstärke 0,15.
Herstellung siehe Anhang

c. Molekulartitration

Die Molekulartitration wurde mit Hilfe des Mikro-
littersystems (25) durchgeführt.

4. Bestimmung der Molekulargewichte der einzelnen C1-Mole-
kulkomplexe mit Hilfe von Marker-Proteinen

Als Marker-Proteine wurden verwendet:

- a) Katalase (Boehringer, Mannheim) Molekulargewicht 230 000
- b) Albumin (Hühnerei) (Boehringer, Mannheim) Molekular-
gewicht 45 000
- c) Aldolase (Boehringer, Mannheim) Molekulargewicht 147 000
- d) Chymotrypsinogen (Boehringer, Mannheim) Molekulargewicht
25 000

Sie wurden entnommen aus dem Calibration Kit for mol.
weight determination

Nr. 15 967 KEAB

633 9403

Febr. 1970

LITERATURÜBERSICHT

1. Becker, E.L.:
J. Immunol. 77, 469 (1956)
Concerning the Mechanism of Complement Action.
II. The Nature of the First Component of Guinea Pig Complement.
2. Becker, E.L.:
Biochem. Biophysic. Acta 147, 289 (1967)
The Relationship of the Structure of Phosphonate Esters to their Ability to Inhibit Chymotrypsin, Trypsin, Acetylcholin, Esterase and C1a.
3. Bing, David H.:
J. Immunol. 107, 1244 (1971)
Purification of the First Component of Human Complement by Affinity Chromatography on Human Globulin Linked to Sepharose.
4. de Bracco, M. and Stroud, R.M.:
J. Immunol. 107, 309 (1971) Abstract
Human C1r: Purification and Assay Based On Its Linking Role.
- 4b. Colton, H.R., Borsos T. and Rapp, H.J.:
J. Immunol. 100, 799 (1968)
Ultracentrifugation of The First Component of C. Effects of Ionic Strength.
- 4c. Davis, G.E.:
Science, 165, 508 (1963)
Inhibition of Guinea Pig Complement in vitro and in vivo by Carrageenan.
- 4d. Donaldson, V.H. and Evans, R.R.:
Amer. J. Med. 35, 37 (1963)
A Biochemical Abnormality in Hereditary Angioneurotic Edema. Absence of Serum Inhibitor of C1 esterase.
5. Ewald, R.W. and Schubarth, A.F.:
J. Immunol. 97, 100 (1966)
Agglutinating Activity Of The Complement Component C1q In The F 11 Latex Fixation Test.
- 5a. Ishizaha, K. und Ihizaha, T.:
J. Immunol 93, 68 (1964)
The Role of Fragment III of γ -Globulin and Its Disulfide Bonds in Passive Sensitization and Complement Fixation.

6. Klein, P. und Hadding, U.:
Drug Research 20, 167 (1970)
Neuere Erkenntnisse der Komplementforschung
7. Klein, P.:
Protides Biol. Fluids 15, 433 (1967)
Inactivation Of C4 by Guinea Pig Euglobulin
8. Lachmann, P.J.:
Proc. Roy. Soc. B. 173, 371 (1969)
The Immunochemistry of Complement
9. Lepow, I.H., Naff, G.B., Todd, E., Pensky, I.,
Hinz, C.F. jr.:
J. Exp. Med. 117, 983 (1963)
Chromatography Resolution of the First Component
of Complement into Three Activities.
10. Linscott, W.D.:
J. Immunol. 105, 1013 (1970)
Complement Fixation: The Effects of Jg G and Ig M
Antibody Concentrations On C1-Binding Affinity.
11. Loos, M., Borsos, T. and Rapp, H.J.:
J. Immunol. 108, 683 (1972)
Activation of the first Component of Complement.
Evidence for an Internal Activation Step.
12. Mayer, Manfred M.:
Immunochemistry, 7, 485 (1970)
Highlights of Complement Research During the Past
Twenty-Five Years.
13. Mayer, Manfred M.:
In: E.A. Kabat and M.M. Mayer
Experimental Immunochemistry
Springfield/III.: Ch.C. Thomas 1961
14. Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.F.:
Immunochemistry, 2, 235 (1965)
Immunochemical Quantitation of Antigens by Singl
Radial Immundiffusion.
15. Müller-Eberhard, Hans J.:
Annual Review of Biochemistry, 38, 390 (1969)
Complement

16. Müller-Eberhard, H.J. and Kunkel, J.G.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106, 291 (1961)
Isolation of a Thermolabile Serum Protein which
Precipitates -Globuline Aggregates and Participates
in Immune Hemolysis.
17. Naff, G.B., Ensky, J. and Lepow, I.H.:
J. Exp. Med. 119, 593 (1964)
The Macromolecular Nature of the first Component of
Human Complement.
18. Nagaki, K. and Stroud, R.M.:
J. Immunol. 102, 421 (1969)
The Relationship of the Hemolytic Activity of Active
C1s to its TAME Esterase Action: A New Method of
Purification and Assay.
19. Nelson, R.A.:
Protides Biol. Fluids 15, 385 (1967)
Proteins of the Complement System and their
Biological Function.
20. Nishioka, K.:
Immunochemistry 3, 501 (1966)
Electrophoresis of Nine Components of Guinea Pig
Complement on Polyacrylamid Gel.
21. Opferkuch, W.:
Habilitationsschrift 1967, Mainz
Der Aufbau der ersten Komplementkomponente als Makro-
molekülkomplex.
22. Polley, M.J.:
J. Immunol. 107, 309 (1971) Abstract
Ultrastructural Studies of C1q and of the Interaction
Between Membranes and Complement Proteins.
- 22a. Rapp, H.J. and Borsos, T.
Appleton-Century-Crofts, New York, 1970
Molecular Basis of Complement Action.
23. Ratnoff, O.D. and Naff, G.B.:
J. Exp. Med. 125, 337 (1967)
The Conversion of C1s to C1-Esterase by Plasmin
and Trypsin.
- 23a. Ratnoff, O.D. und Lepow, I.H.:
J. Exp. Med. 106, 327 (1957)
Some Properties of an Esterase Derived from
Preparations of the First Component of Complement.

24. Ringelmann, R.:
Habilitationsschrift, Mainz (1969)
Studien über den Mechanismus der Komplementaktivierung.
Analyse der ersten Reaktionsschritte.
25. Ringelmann, R., Opferkuch, W., Röllinghoff, M. und
Loos, M.:
Z. Med. Mikrobiol. Immunol. 154, 329 (1969)
Komplementmessung mit Hilfe des Mikrolitersystems.
26. Sakai, K. and Stroud, R.M.:
Fed. Proc. 31, 739 (1971) Abstracts
Human C1s: Purification and further Characterization.
27. Sassano, F.G., Colton, H.R., Borsos, T. and Rapp, H.J.:
Immunochemistry 9, 405 (1972)
Resolution of the First Component (C1) of Guinea Pig
Fragment Into Three Subunits and their Hybridization
with Human C1 Subunits.
28. Sledge, Carlos R. and David H. Bing:
Fed. Proc. 31, 739 (1971) Abstracts
Purification of the Human Complement Protein C1q by
Affinity Chromatography.
29. Svehag, Sven-Eric and Bloth, B.:
Acta Path. Microbiol. Scand. Section B 78, 260 (1970)
The Ultrastructure of Human C1q.
- 29a. Tamura, N. und Nelson, R.A.:
J. Immunol. 101, 1333 (1968)
The Purification and Reactivity of C1 of Complement
from Guinea Pig, Human and Canine Sera.
30. Taubmann and Lepow, I.H.:
J. Immunol. 107, 309 (1971)
Cleavage of C1s by Proteolytic Enzymes.
31. Wagner, H. and Röllinghoff, M.:
Immunochemistry 7, 977 (1970)
C2-The Second Component of Guinea Pig Complement:
Purification and Physico-Chemical Characterization.
32. Wunderlich, R. und Ringelmann, R.:
Med. Mikrobiol. Immunol. 157, 120 (1972)
Eine Methode zur spezifischen Reinigung der
ersten Komplementkomponente C1.

33. Wunderlich, R.:

Dissertation 1970

Die erste Komplementkomponente: Ein Makromolekül
oder ein System aus Unterfaktoren?

34. Yonemasu, K. and Stroud, R.M.:

J. Immunol. 106, 304 (1971)

C1q: Rapid Purification Method For Preparation of
Monospecific Antisera and for Biochemical Studies.

35. Yonemasu, K., Stroud, R.M., Niedermeier, W.,
Butler, W.T.:

Biochemical and Biophysical Research Communication
43, 1388 (1971)

Chemical Studies on C1q; A Modulator of Immunglobulin
Biology.

36. Yonemasu, K. and Stroud, R.M.:

Immunochemistry 9, 545 (1972)

Structural Studies on Human C1q: Non-Covalent and
Covalent Subunits.

Lebenslauf

Ich, Rainald Hussong, wurde am 30. 3. 1944 in Greiz/Gera als Sohn des Chemikers, Dr. Maximilian Hussong, und seiner Ehefrau Ingeborg Hussong geb. Jäger geboren.

Nach Absolvierung der Volksschule sowie der höheren Schule in Lahnstein und Tutzing, wo ich auch das Zeugnis der Reife erlangte, konnte ich am 10. Oktober 1966 das Studium der Medizin an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz beginnen.

Nach bestandenem Physikum im September 1969, erlangte ich im Dezember 1972 das Medizinische Staatsexamen an der Johannes-Gutenberg-Universität. Vom 1. Januar bis 31. April war ich dann in Mainz als Medizinalassistent an der I. Medizinischen Klinik, sowie anschließend bis 31. August an der Universitätsfrauenklinik tätig. Seit 1. September bin ich auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Ochsenhausen beschäftigt. Nach meiner Approbation werde ich die Facharztausbildung für Gynäkologie beginnen.

Seit 18. 12. 1970 bin ich mit der Apothekerin Susanne Hussong geb. Ruprecht verheiratet. Am 28. September 1972 wurde unsere Tochter Annette, Franziska geboren.

